

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年7月14日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/063978 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/00, C07K 16/18,
16/42, G01N 33/53, 33/543, C12P 21/08

5990301 大阪府泉南郡岬町淡輪 3631-24 Osaka
(JP). 薬王 郁久 (YAKUO, Ikuhisa) [JP/JP]; 〒6408223
和歌山県和歌山市湊北町 1 丁目 41 番地 Wakayama
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019694

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安
田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2004年12月22日 (22.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(30) 優先権データ:
特願 2003-434618

2003年12月26日 (26.12.2003) JP
特願2004-289939 2004年10月1日 (01.10.2004) JP

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 大日本製
薬株式会社 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒5418524 大阪府大阪市中央区道修町
二丁目 6 番 8 号 Osaka (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 伊藤 幸治 (ITO,
Koji) [JP/JP]; 〒2760046 千葉県八千代市大和田新田
59-56 Chiba (JP). 早川 忍 (HAYAKAWA, Shinobu)
[JP/JP]; 〒4810012 愛知県西春日井郡師勝町大字久
地野字権現 92 番地の 1 Aichi (JP). 舟岡 宏幸 (FU-
NAOKA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒6740082 兵庫県明石市
魚住町中尾 552-2 番 403 号 Hyogo (JP). 細江
宏彰 (HOSOE, Hiroaki) [JP/JP]; 〒5720042 大阪府寝
屋川市東大利町 18-2 シティコート寝屋川 206
Osaka (JP). 西村 誠 (NISHIMURA, Makoto) [JP/JP]; 〒
5650824 大阪府吹田市山田西 3 丁目 22-72 Osaka (JP). 大軽 靖彦 (OHKARU, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FRACTION AND ANTIBODY COMPRISING GUINEA PIG IMMUNOGLOBULIN E

(54) 発明の名称: モルモット免疫グロブリンEからなる画分及び抗体

(57) Abstract: It is intended to provide a guinea pig immunoglobulin E fraction purified from the blood of a guinea pig having been sensitized with an allergen; an anti-guinea pig immunoglobulin E antibody having a high specificity which is obtained by using the above fraction as an antigen; and a reagent for immunoassaying guinea pig immunoglobulin E which contains the above antibody.

(57) 要約: アレルゲンで感作されたモルモットの血液から分離され精製されたモルモット免疫グロブリンE画分、
該画分を抗原として得られた特異性の高い抗モルモット免疫グロブリンE抗体、及び該抗体を含むモルモット免疫
グロブリンEの免疫測定用試薬を提供する。

A1

WO 2005/063978

明細書

モルモット免疫グロブリンEからなる画分及び抗体

技術分野

本発明は、特定の性状を有する本質的に精製されたモルモット免疫グロブリ
5 ンE（以下「IgE」ということもある）からなる画分に関する。また本発明
は、前記画分をヒト以外の動物に免疫して製造されるモルモットIgEを特異
的に認識することができる抗体（以下「抗モルモットIgE抗体」ということ
もある）及び該抗体を含むモルモットIgEの免疫測定用試薬に関する。

背景技術

10 生体内に異物が侵入した場合、それを排除しようとして免疫反応が起こる。
この免疫反応が過剰になった結果、生体に対して種々の病的症状をもたらす病
態をアレルギーという。現在、乳幼児を中心としてアトピー性皮膚炎や喘息に
代表される種々のアレルギー疾患患者が激増し、社会問題となっている。これ
らのアレルギー疾患の多くは、個々のアレルゲン（抗原）に対するIgE（抗
15 体）が過剰に産生されることによって発症するI型（即時型）アレルギーであ
る。

I型アレルギーにおけるIgEの産生調節メカニズムの解明や、アレルギー
を抑制する薬物の研究・開発が進められている。IgEの関与が大きいこのよ
うなI型アレルギーの実験現場では、例えば、受動皮膚アナフィラキシー反応
20 (passive cutaneous anaphylaxis、以下「PCA反応」という)に代表される
ように実験動物としてモルモットが使用されることが多い。

特開2000-266747号公報には、抗ラットIgE抗体及び該抗体を
含むラットIgEの測定用キットが記載されており、特開2000-2667
25 48号公報には、抗マウスIgE抗体及び該抗体を含むマウスIgEの測定用
キットが記載されている。これらの両文献には抗モルモットIgE抗体及び該
抗体を含むモルモットIgE抗体の測定用キット（試薬）は記載されていない。

5年、第77巻、p. 438-444には、寄生虫を感染させたモルモットの血清からIgEが豊富に含まれる画分を分離して、該画分を抗原としてウサギに免疫して製造された抗モルモットIgE抗体が記載されている。しかしながらここに記載されているモルモットIgEを豊富に含む画分は、他のクラスの免疫グロブリン、例えば免疫グロブリンGも相当量含んでいると考えられる。そのため、該画分を抗原として得られた抗体（抗血清）は、モルモットIgEに対する特異性が低く、そこから抗モルモットIgE抗体を得るためには、抗血清を正常モルモット血清によって中和する必要があった。また、“Int Arch Allergy Appl Immunol”、1988年、第87巻10、p. 424-429及び“ANNALS OF ALLERGY”、1981年、第47巻、p. 52-56にも前記文献と同様な画分及び抗体が記載されている。

“Journal of Immunological Methods”、1991年、第139巻、p. 123-134には、モルモット血液中の免疫グロブリン画分から、免疫グロブリンの各クラスを分離する方法が開示されている。そして、その図8にはクロマトグラフィーにより分離された各フラクションのSDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法）による結果が示されているが、PCA反応の活性を指標としてIgEが含まれるとするフラクション3及び4の結果には、他のフラクションと区別できる固有の主バンドが形成されていない。これは、前記2つのフラクションには、その存在がSDS-PAGEでは捉えられない極微量のIgEしか含まれていないためであると考えられる。

仮にこのようなフラクションを抗原として使用したとしても特異性の高い抗モルモットIgE抗体を製造することはできない。

25 以上のとおり、これまで特異性に優れた抗モルモットIgE抗体及び該抗体を製造するための純度の高い抗原、すなわち、高純度のモルモットIgEはこれまで製造されていなかったし、その性状も知られていなかった。

発明の開示

前述のように、現在 I g E が関与するアレルギーの実験系として、モルモットの P C A 反応が実施されている。しかしながら、P C A 反応は I g E それ自身を定量的に測定するものではない。P C A 反応においては、I g E と結合した肥満細胞が抗原により刺激され、放出されたケミカルメディエーター（ヒスタミン、ロイコトリエンなど）が血管に作用し、そこから漏出する色素量を測定することによって、アレルギー反応の程度を推測しているに過ぎない。

このような状況において、アレルギーの実験現場においては、特異性の高い抗モルモット I g E 抗体及び該抗体を含む精度の高いモルモット I g E 測定用試薬の開発が望まれていた。

本発明は、高度に精製されたモルモット I g E からなる画分、該画分を抗原として使用することによって製造される特異性に優れた抗モルモット I g E 抗体及び、高い測定感度を有するとともに正確かつ簡便なモルモット I g E の免疫測定用試薬を提供することを目的としている。

15 本発明者らは、アレルゲン、特に卵白アルブミン（ovalbumin、以下「O V A」）ということもある）で感作されたモルモットの血液から分離された免疫グロブリン画分より I g E からなる画分を精製し、その性状を確認した。そして、この画分を抗原として使用することにより製造された抗モルモット I g E 抗体がモルモット I g E を特異的に認識すること、さらには、この抗体を利用して 20 I g E の免疫測定系を組み立てたところ高い感度で正確にモルモットの I g E が測定できることを見いだし、本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

[1] アレルゲンで感作されたモルモットの血液から分離され、S D S - P A G E により免疫グロブリン E の単一の主バンドを得るのに充分な純度をもつ本 25 質的に精製された下記性状を有するモルモット免疫グロブリン E からなる画分；

（1）前記主バンドの分子量は約 2 0 0 k D a である、

(2) モルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体を製造するための抗原として使用できる、

(3) モルモットにおけるP C A反応が陽性である、

5 (4) 実質的にモルモット免疫グロブリンGを含有しない。

[2] 上記〔1〕に記載の画分において、主バンドの分子量が187～195 kDa であるモルモット免疫グロブリンEからなる画分。

[3] モルモット免疫グロブリンEの分子量が質量分析法により測定して約186 kDa である上記〔1〕又は〔2〕に記載のモルモット免疫グロブリンE

10 からなる画分。

[4] 前記主バンドが還元性S D S - P A G E により2つに分離され、分離後の各バンドの分子量が約70 kDa 及び約30 kDa である、上記〔1〕～〔3〕に記載の画分。

[5] アレルゲンが卵白アルブミンである上記〔1〕～〔4〕に記載のモルモット免疫グロブリンEからなる画分。

[6] 上記〔1〕～〔5〕に記載の免疫グロブリンEからなる画分でもってヒト以外の動物を免疫して製造されるモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体。

[7] 抗体がモノクローナル抗体である上記〔6〕に記載のモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体。

[8] 抗体がモルモット免疫グロブリンG又は免疫グロブリンMと実質的に交差反応しないものである上記〔6〕又は〔7〕に記載の抗体。

[9] モルモット免疫グロブリンG及び免疫グロブリンMとの交差反応率が0.0001%未満であるモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体。

[10] 上記〔6〕～〔9〕に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

[11] 上記〔6〕～〔9〕に記載の抗体及び酵素標識された前記抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

[12] 免疫測定用試薬がサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法を実施するための試薬である上記〔10〕又は〔11〕に記載のモルモット免疫グロブリン

5 Eの免疫測定用試薬。

[13] 固相化された上記〔6〕～〔9〕に記載の抗体及び標識物質により標識された卵白アルブミンを含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

[14] 固相化された卵白アルブミン及び標識物質により標識された上記〔6〕～〔9〕に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

10 [15] 標識物質が酵素である上記〔13〕又は〔14〕に記載のモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

[16] モルモット免疫グロブリンEが卵白アルブミンを認識する免疫グロブリンEである上記〔13〕～〔15〕のいずれかに記載の免疫測定用試薬。

[17] 固相化されてなる上記〔6〕～〔9〕に記載の抗体。

15 [18] モルモット免疫グロブリンEを製造または精製するための上記〔17〕に記載の抗体。

上記本発明〔1〕によれば、抗モルモットIgE抗体を製造するための高度に精製された抗原を提供することができる。上記本発明〔6〕は、特異性に優れた抗モルモットIgE抗体を提供するものであり、それを含む上記本発明〔20〕によって、血液等の生体試料中のモルモットIgEを高感度で、正確かつ簡便に測定することができる。

また、本発明〔13〕によれば、OVAを抗原抗体反応によって認識するモルモット免疫グロブリンEを特異的に測定することができる。

また、本発明〔17〕によれば、モルモット免疫グロブリンEを高純度に製25 造または精製することができる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のモルモットIgE画分の主バンドの分子量を表すSDS-

PAGEによる分析結果である。

図2は、本発明のモルモットIgE画分の還元性SDS-PAGEによる分析結果である。

図3は、本発明のモルモットIgE画分のモルモットPCA反応の実験結果5である。

図4は、本発明のモルモットIgE画分が実質的にIgGを含有しないことを示すウェスタンブロッティングの分析結果である。

図5は、本発明のモルモットIgEの免疫測定用試薬を使用して作成した標準曲線である。

10 図6は、本発明のモルモットIgEの免疫測定用試薬の希釈試験（検体1～3）の結果である。

図7は、実施例5（3）項において作成した標準曲線である。

図8は、実施例5（4）項の（ア）の希釈試験の結果である。

15 図9は、実施例5（4）項の（オ）のPCA反応との相関性試験の結果である。

図10は、分子量曲線の作成に用いた本発明のモルモットIgE画分のSDS-PAGEによる分析結果である。

図11は、本発明のモルモットIgE画分の質量分析の結果である。

発明を実施するための最良の形態

20 本発明は、アレルゲンで感作されたモルモット血液から分離され、特定の性状を有するモルモット免疫グロブリンEからなる画分（以下「モルモットIgE画分」という）に関する。

本発明のモルモットIgE画分は、アレルゲンで感作されたモルモット血液の免疫グロブリン画分から精製されたものである。

25 アレルゲンとしては、そのものでもってモルモットを感作した場合に、その血液中にIgEを過剰に産生せしめるものであれば、特に制限されずこの分野で公知の何れのものも使用することができる。このようなアレルゲンとして例

えば、OVA、ダニ抗原、寄生虫、寄生虫抽出蛋白、ウマ血清などが挙げられるが、これらの中でも、入手や取り扱いが容易な点においてOVAが好ましい。

感作は、常法、例えばアレルゲンをモルモット腹腔内に一定期間にわたって投与することにより行なうことができる。免疫グロブリン画分は、このように 5 してアレルゲンによって感作されたモルモットの血液を採取し、飽和硫酸アンモニウム塩析法などの公知の処理をなすことにより製造することができる。

このようにして得られるモルモットの免疫グロブリン画分より、それ自体公知の物理化学的手段を複数組み合わせることによって、本発明のモルモット IgE 画分を製造することができる。

10 例えれば、免疫グロブリン画分中に大量に含まれる免疫グロブリンGを除去するためには、プロテインGカラムやDE52陰イオン交換樹脂を利用する方法がとられる。また、モルモットIgE画分の精製のためには、Q-Sephadex™カラムクロマトグラフィーやMonoQ™カラムクロマトグラフィーなどの陰イオン交換処理、Superdex™200カラムクロマトグラフィーなどのゲル滻過カラム処理などが行なわれる。なお、これらの物理化学的手段の各々は、必要に応じて、複数回繰り返し実施してもよい。

上記各物理化学的手段においては、各手段に応じて通常使用される溶媒を特別な制限なく、適宜使用することができる。

より具体的には、後記実施例に記載されている方法によって本発明のモルモットIgE画分を製造することができる。

かくして得られる本発明のモルモットIgE画分が前記のような諸性状を有することは、後記実施例に示すとおりである。

本発明のモルモットIgE画分中に含まれるIgEの純度は高い方が、抗原として使用した場合に、より特異性の高い抗IgE抗体を得ることができる点 25 において好ましい。

また、本発明は、上記モルモットIgE画分でもってヒト以外の動物を免疫して製造されるモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる

抗体に関する。

本発明の抗体は、モルモットの IgE を特異的に認識する抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の何れでもよいが、特異性及び均一性が高い点においてモノクローナル抗体の方が好ましい。

5 ポリクローナル抗体は、本発明のモルモット IgE 画分を抗原として使用し、ヒト以外の動物を免疫することにより製造することができる。詳細には、前記のようにして得られたモルモット IgE 画分を適当なアジュバントと混合してウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリなどのヒト以外の動物に免疫し、血液を採取して公知の処理をなすことによって製造することができる。
10 またモノクローナル抗体は、このように免疫された動物の脾臓細胞を採取し、ミルシュタインらの方法によりミエローマ細胞との細胞融合、抗体産生細胞スクリーニング及びクローニング等を行い、抗モルモット IgE 抗体を產生する細胞株を樹立し、これを培養することにより製造することができる。

15 このようにして得られた抗モルモット IgE 抗体は、モルモットの IgE に対する特異性が極めて高く、他のクラスの免疫グロブリン、例えば、通常血液中において IgE よりもはるかに大量に存在するとされている免疫グロブリン G を認識しないものである。

本発明の抗 IgE 抗体は、後述する本発明の免疫測定用試薬において好適に使用することができる。

20 さらに本発明は、上記抗モルモット IgE 抗体を含むモルモット IgE の免疫測定用試薬に関する。

本発明のモルモット IgE の免疫測定用試薬は、本発明の抗モルモット IgE 抗体の抗原に対する高い特異性に基づくものであり、種々の免疫測定法を実施するための試薬として有用である。ここにおける免疫測定法としては、抗原
25 ・抗体反応を含む測定法であればいずれでもよく、例えば、酵素免疫測定法 (EIA 法)、ラテックス凝集法、イムノクロマト法、放射免疫測定法 (RIA 法)、蛍光免疫測定法 (FIA 法)、ルミネッセンス免疫測定法、エバネッセンス

波分析法などが挙げられる。これらの中でも、EIA法やラテックス凝集法を実施するための本発明の試薬が操作の容易性の観点からして好適である。

本発明の免疫測定用試薬としてEIA法を実施するための試薬を選択した場合、EIA法がモルモットIgEに存在する異なるエピトープを認識する2種類の抗モルモットIgE抗体を用いたサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法（サンドイッチELISA法）であるのが好ましい。

また、サンドイッチELISA法の一種としてアビジンービオチン反応を利用した方法もある。本法は、試料中のモルモットIgEを固相化抗モルモットIgE抗体でもって捕捉し、捕捉されたモルモットIgEとビオチンで標識した抗体との間で抗原抗体反応を行わせ、次に、酵素標識ストレプトアビジンを加えて、アビジンービオチン反応を行わせることを測定原理としている。

このようなサンドイッチELISA法は、2種類の抗体を用いることから抗原に対する特異性が優れており、他のクラスの免疫グロブリンが混在する試料中のモルモットIgEを正確に測定することができる。

本発明のサンドイッチELISA法を実施するための試薬は、固相化抗モルモットIgE抗体及び酵素またはビオチン標識抗モルモットIgE抗体から構成される。

サンドイッチELISA法を実施するための試薬に含まれる2種類の抗モルモットIgE抗体は、モノクローナル抗体同士、ポリクローナル抗体同士又はモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組合せの何れでも良い。

固相化抗モルモットIgE抗体は、前述のようにして得られた抗体を、例えば、マイクロプレートウェル、プラスチックビーズ、磁気ビーズ、クロマトグラフィー用担体（例、SephadexTM）などの固相に結合させることにより製造することができる。固相への結合は通常、抗体をクエン酸緩衝液等の適当な緩衝液に溶解し、固相表面と抗体溶液を適当な時間（1～2日）接触させることにより行なうことができる。固相化抗モルモットIgE抗体は、モルモットIgEの測定のみならず、後記実施例4の添加回収試験に示されるように、モルモ

ット I g E の回収率が良好であり、その性質を利用してモルモット I g E の製造または精製にも使用することができる。

さらに、非特異的吸着や非特異的反応を抑制するために牛血清アルブミン (B S A) や牛ミルク蛋白等のリン酸緩衝溶液を固相と接触させ、抗体によって 5 コートされなかった固相表面部分を前記 B S A や牛ミルク蛋白等でブロックイングすることが一般に行なわれる。

酵素標識抗モルモット I g E 抗体は、上記固相化した抗体とは異なるエピトープを認識する抗モルモット I g E 抗体と酵素とを結合（標識）させることにより製造することができる。該抗体を標識する酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられる。これらの酵素と抗モルモット I g E 抗体との結合はそれ 10 自体公知の方法、例えば、グルタルアルデヒド法、マレイミド法などにより行なうことができる。

また、ビオチン標識抗モルモット I g E 抗体はビオチンと抗モルモット I g 15 E 抗体とを周知の方法により結合させることにより製造することができる。例えば、市販のビオチン標識化キットを使用して、ビオチンと抗モルモット I g E 抗体とを結合させることができる。

サンドイッチ E L I S A 法を実施するための本発明の試薬には上記抗モルモット I g E 抗体以外に必要に応じて、標準物質、洗浄液、酵素活性測定用試薬 20 （基質剤、基質溶解液、反応停止液等）などを構成試薬として含んでいてよい。また、アビジン-ビオチン反応を利用した方法を実施するための本発明の試薬には、さらに酵素標識ストレプトアビジンを含んでいてよい。

所望により試薬に含まれる基質剤としては、選択した標識酵素に応じて適当なものが選ばれる。例えば、酵素としてペルオキシダーゼを選択した場合においては、o-フェニレンジアミン (O P D)、テトラメチルベンチジン (T M B) などが使用され、アルカリホスファターゼを選択した場合においては、p-ニトロフェニルホスフェート (P N P P) などが使用される。また、反応停止

液、基質溶解液についても、選択した酵素に応じて、従来公知のものを特に制限なく適宜使用することができる。

本発明の別の好ましい形態である、ラテックス凝集法を実施するための試薬には、抗モルモット IgE 抗体はラテックス感作抗モルモット IgE 抗体の形 5 で含まれる。ラテックス粒子と抗体との感作（結合）は、この分野で公知の方法、例えば、架橋剤としてカルボジイミドやグルタルアルデヒド等を利用する化学結合法や物理吸着法により成すことができる。

ラテックス凝集法を実施するための試薬には、上記ラテックス感作抗モルモット免疫グロブリン抗体以外に、必要に応じて、希釈安定化緩衝液、標準物質 10 などを含んでいてもよい。

なお、本発明の別の実施形態である放射免疫測定法（RIA 法）、蛍光免疫測定法（FIA 法）、ルミネッセンス免疫測定法などを実施するための試薬も上記 EIA 法やラテックス凝集法を実施するための試薬に準じて常法に従い製造することができる。

15 以上のようにして製造された、本発明のモルモット IgE の免疫測定用試薬は、免疫グロブリン E のみを特異的に測定できるものであり、他のクラスの免疫グロブリン、例えば、後記実施例に示すように免疫グロブリン G、免疫グロブリン M とは交差しない。

また本発明は、固相化された前記抗モルモット IgE 抗体及び標識物質により標識された OVA を含むモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬に関する。

固相化された前記抗モルモット IgE 抗体は、上記サンドイッチ ELISA の場合と同様にして製造することができる。

25 OVA を標識する標識物質としては、酵素、蛍光物質、放射性物質等が挙げられる。酵素の具体例としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼなどが挙げられる。また、蛍光物質としては、例えば、フルオレッセン又はその誘導体が挙げられ、放射性

物質としては、例えば、¹²⁵I が挙げられる。このような標識物質のうち、取扱いが容易である点において酵素が好ましい。

標識されたOVAは、公知のグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法またはマレイミド法などの方法により、OVAと標識物質とを結合せしめることによつて5 製造することができる。例えば、酵素標識OVAの具体的な製造方法は後記実施例に示すとおりである。

このようにして製造された、固相化抗モルモットIgE抗体及び標識OVAを含む本発明の免疫測定用試薬は、OVAを認識するモルモットIgEの濃度を特異的に測定するものである。その測定の機構は以下のとおりである。

10 マイクロプレート等に固相化された本発明の抗モルモットIgE抗体に検体中のIgEが捕捉され、そこに標識物質で標識されたOVAが添加されると、標識OVAは捕捉されたIgEの中、OVAを認識するIgEのみに結合し、その標識物質の量を公知の方法により測定することによって、OVAを認識するモルモットIgEを特異的に測定することができる。

15 上記の機構において、固相化抗体に代えて固相化OVAを使用し、標識OVAに代えて標識抗体を使用することによっても、OVAを認識するモルモットIgEを測定することができる。従って、本発明の試薬は、固相化されたOVA及び標識物で標識された前記抗モルモットIgE抗体を含むモルモットIgEの免疫測定用試薬の形態で実現されてもよい。

20 なお、OVAの固相化は、前述の抗モルモットIgE抗体の場合と同様にして行うことができる。

25 このようなモルモットIgEの免疫測定用試薬には、前述のサンドイッチELISA法による試薬と同様に、必要に応じて標準物質、洗浄液などを構成試薬として含んでいても良い。標識物質が酵素の場合には、さらに基質剤、基質溶解液、反応停止液などの酵素活性測定用試薬を構成試薬として含んでいても良い。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に例示するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1；モルモット I g E 画分の製造

(1) アレルゲンの感作

5 10 μ g のOVAと 4mL の水酸化アルミニウムゲルを混和し、モルモット (Hartley 系、約 600 g、雌) の腹腔内に投与した。その後直ちに、百日咳ワクチン (2.5×10^{10} 菌体／個体) を同様にして腹腔内に投与した (初回感作)。12 日後に 250mg/kg の用量でシクロフォスファミドを腹腔内投与 (生理食塩水 4mL) した。その後、初回感作と同様な方法で 2 週間間隔で 8 回感作した。感作が 10 完了した後、ジエチルエーテル麻酔下で開胸し、心臓より採血した。血液を遠心分離 (3000rpm, 10min, 4°C) し、血清 35mL を回収した。

(2) 免疫グロブリン画分の分離

上記 (1) により得られた血清を遠心分離 (18,000rpm \times 15min) し、上清に 15 等量の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を加えた。この混合液と等量の 鮫和硫安溶液を氷冷下にて攪拌しながら滴々添加し (50% 鮫和硫安)、添加後 20 分間攪拌した。次に遠心分離し (18,000rpm \times 30min)、得られた沈殿を 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に溶解し、10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に対して透析し、免疫グロブリン画分液を得た。

(3) モルモット I g E 画分の精製

20 上記 (2) において得られた免疫グロブリン画分液を遠心分離し (18,000rpm \times 30min) 内溶液中の混濁物を除去後、陰イオン交換樹脂 (DE52) を 100mL 充填し、10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で平衡化したカラムに展開した。10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) でカラムを洗浄後、次に 35mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で I g E を溶出させた。DE52 の I g E 溶出画分 25 液を 50% 鮫和硫安とし 20 分間攪拌後、遠心分離した (18,000rpm \times 30min)。得られた沈殿を 20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で溶解し、同様の緩衝液にて透析を行い、I g E 含有溶液を得た。硫安精製後の I g E 含有溶液を 20m

M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で平衡化した Protein G カラム (Protein G Sepharose 4 Fast Flow [商品名]、カラムサイズ；1. 6 × 3 cm、アマシャムバイオサイエンス社) に展開した (流速 0. 5 mL/分)。同緩衝液での素通り画分を分取した。再度 Protein G カラムへ同条件にて展開し、素通り画分を 5 回収し、10mM Na, K リン酸緩衝液 pH7.5 に対して透析した。

Protein G 処理後の透析内液を Q-Sepharose F. F. column (Q-Sepharose Fast Flow [商品名]、カラムサイズ；1. 6 × 8. 5 cm、アマシャムバイオサイエンス社) に展開した (Buffer A=10mM Na, K リン酸緩衝液 pH7.5, Buffer B=0.3M Na, K リン酸緩衝液 pH7.5, Flow=3mL/min, Fraction size=3mL, Gradient=0%B for 10 5min. 0-100% B in 90min)。後述する PCA 反応試験により 1 g E 溶出画分を決定した。

Q-Sepharose 1 g E 溶出画分液を限外ろ過にて濃縮し、Superdex 200 column (Superdex 200 XK16/60 [商品名]、カラムサイズ；1. 6 × 60 cm、アマシャムバイオサイエンス社) に展開した (流速；1 mL/分、フラクションサイズ；1 mL、溶出液；50 mmol/L MES, 0.1mol/L NaCl, pH6.5)。PCA 反応試験により 1 g E 溶出画分を決定し、10mM Na, K リン酸緩衝液 pH7.5 に対して透析した。

Superdex 200 column の 1 g E 溶出画分を Mono Q column (Mono Q HR5/5 [商品名]、カラムサイズ；0. 5 × 5 cm、アマシャムバイオサイエンス社) に展開した (Starting buffer (buffer A) : 0.01M Na, K phosphate buffer pH7.5, Gradient buffer (buffer B) : 0.3M Na, K phosphate buffer pH7.5, Gradient : sample チャージ後、0% B for 5min, 0-100% B in 30min、流速 1.0ml/min、UV range 0-0.2)。後述する PCA 反応試験により 1 g E 溶出画分を決定し、モルモット 1 g E 画分を得た。

25 (4) モルモット 1 g E 画分の諸性状

上記 (3) で得られたモルモット 1 g E 画分の諸性状は以下のとおりであった。

[1] SDS-PAGEにより IgEの単一の主バンドが得られ、その主バンドの分子量は約200kDaである；

SDS-PAGE (1)

モルモットIgE画分を非還元性試料用緩衝液 (62.5 mmol/L Tris-HCl pH6.8 5%、25%グリセロール、2% SDS及び0.01%プロムフェノールブルー) に溶解し、100°Cで3分間加熱後、SDS-PAGEを行った。アクリルアミド濃度が5～20%濃度勾配のゲル (E-T520L型、アトー社) で試料を分離した。電気泳動緩衝液として、62.5 mmol/L Tris-HCl pH8.3、192mmol/L グリシン、0.1% SDSを使用した。40mAで80分間電気泳動した後、ゲルを銀染色 (銀染色キットワ 10 コー、和光純薬工業) した。分子量マーカーとして、HMW SDS マーカーキット (ミオシン[212,000Da]、 α_2 マクログロブリン[170,000Da]、 β ガラクトシダーゼ[116,000Da]、トランスフェリン[76,000Da]、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ[53,000Da]、アマシャムバイオサイエンス社) を使用した。

図1に示すように、分子量約200kDaのところに、単一の主バンドが認められた (レーン1；マーカー、レーン2；モルモットIgE画分)。

SDS-PAGE (2)

分子量を詳細に求めるために、アクリルアミド濃度が7.5%濃度のゲル (E-T7.5L型、アトー社) を用いてSDS-PAGEを前記と同様にして行った。なお、ゲルはクマシー染色 (Bio-safe Coomassie, Bio-Rad社) した。分子量マーカーは前記と同じものを使用し、分子量曲線を作成して、本画分の分子量範囲を求めた。その結果、分子量範囲は187kDa～195kDaであった。

図10にこの時のSDS-PAGEの結果を示す (レーン1；マーカー、レーン2；モルモットIgE画分)。

質量分析

モルモットIgE画分の質量分析を下記の条件で行った。

機器；AXIMA-CFR plus (島津製作所)

レーザー光源；窒素封入型レーザー ($\lambda = 337.1\text{nm}$)

検出イオン；正イオン

飛行モード；リニアモード

加速電圧；20 kV

遅延引き出し；オン (m/z180000 に最適化)

5 Beam Blanking ; m/z10000 以下のイオン検出を排除

マトリクス溶液；20mg の sinapinic acid をアセトニトリル 350 μL と 0.1% の TFA (トリフルオロ酢酸) 350 μL の混合溶媒で溶解して調製した。

質量較正；Invitromass High Molecular Weight Mass Calibration Kit (Invitrogen 社) の 160kDa Mass Calibrant を用いた。160kDa Mass Calibrant

10 の $[M + H]^+$ m/z156081、 $[M + 2 H]^{2+}$ 79541 及び $[3 M + 2 H]^{2+}$ 238621 を用い、外部標準法にて較正した。

試料調製；試料原液 (モルモット免疫グロブリン画分) 0.5 μL をサンプルプレートにアプライした直後にマトリクス溶液 0.5 μL をさらに加え、風乾した後、測定した。

15 測定の結果、図 1 1 に示すように、主成分として m/z185596 が検出された。なお、m/z92883 及び m/z62892 はそれぞれ、主成分の $[M + 2 H]^{2+}$ 及び $[M + 3 H]^{3+}$ イオン、m/z126388 は主成分の $[2 M + 3 H]^{3+}$ イオンと考えられる。従って、本試料に含まれるモルモット IgE の分子量の計測値は 185596 であった。

20 [2]前記主バンドは還元性 SDS-PAGE により 2 つに分離され、分離後の各バンドの分子量は約 70 kDa 及び約 30 kDa である；

モルモット IgE 画分を還元性試料用緩衝液 (62.5 mmol/L Tris-HCl pH6.8、350 mmol/L ジチオスレイトール、25% グリセロール、2% SDS 及び 0.01% ブロムフェノールブルー) に溶解し、100°C で 3 分間加熱後、SDS-PAGE を行った。アクリルアミド濃度が 5~20% 濃度勾配のゲル (E-T520L 型、アトー社) で試料を分離した。電気泳動緩衝液として、62.5 mmol/L Tris-HCl pH8.3、192 mmol/L グリシン、0.1% SDS を用いた。40mA で 80 分間電気泳動した後、上

記と同様にしてゲルを銀染色した。分子量マーカーとして、LMW マーカーキット (ホスフォリラーゼ b [97,000Da]、アルブミン [66,000Da]、卵白アルブミン [43,000Da]、カルボニックアンヒドラーーゼ [30,000Da]、トリプシンインヒビター [20,100Da]、 α -ラクトアルブミン [14,400Da]、アマシャムバイオサイ 5 エンス社) を使用した。

図 2 に示すように、モルモット I g E 画分の還元性 SDS-PAGE により、上記[1]において認められた約 200 kDa の主バンドは認められず、約 70 kDa と約 30 kDa のバンドが認められた (レーン 1 ; マーカー、レーン 2 ; モルモット I g E 画分)。

10 [3]モルモット I g E を特異的に認識することができる抗体を製造するための抗原として使用できる；

この性状については、後記実施例 2 に記載されているとおりである。

[4]モルモットにおける PCA 反応が陽性である；

モルモット I g E 画分を生理食塩水を用いて、蛋白濃度が 31.3、62.5、125 15 及び 250ng/mL となるように希釈系列を調製した。モルモット (Hartley、雌、4 50 ~ 600 g) をエーテル麻酔し、背皮毛を刈り、皮膚に調製したモルモット I g E 画分を 0.1mL ずつ皮内注射した。8 日間飼育後、前肢より、1mg/mL OV A 及び 1 %エバンスブルーの生理食塩水液を 1mL 注入し、30 分放置した。図 3 20 に示すように、屠殺後の皮膚裏側にはモルモット I g E 画分の蛋白濃度依存的に青斑が認められた。

[5]実質的にモルモット免疫グロブリン G を含有しない；

モルモット I g E 画分を精製する過程における Protein G カラムクロマトグラフィーにて、カラムに吸着した I g G を溶出し、モルモット I g G 画分とした。モルモット I g G 画分とモルモット I g E 画分を上記非還元性条件にて SDS-PAGE を行った (図 4 参照。レーン 1 ; マーカー、レーン 2 ; モルモット I g G 画分、レーン 3 ; モルモット I g E 画分)。

ホライズプロット (アト一社) にてゲル中の分離された蛋白をニトロセルロ

ース膜に転写した (131mA で 1 時間)。転写後のニトロセルロース膜をブロッキング溶液 (2%ブロックエース [登録商標] 粉末) 中で室温にて 30 分間振盪した後、洗浄液 (20mmol/L Tris, 500mmol/L NaCl, 0.05% Tween [登録商標] -20, pH7.5) 中で室温にて 10 分間振盪した。ヤギ抗モルモット IgG 抗体 (ケミコン社) をブロッキング溶液にて最終抗体濃度が 10 μ g/mL となるように希釈した。洗浄後のニトロセルロース膜を 10 μ g/mL に希釈したヤギ抗モルモット IgG 抗体で室温にて 1 時間振盪した。ニトロセルロース膜を洗浄液中で室温にて 5 分間振盪し、洗浄液を除去後、洗浄液を加えて再度室温にて 5 分間振盪した。洗浄後のニトロセルロース膜を、ブロッキング溶液にて西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ブタ抗ヤギ IgG 抗体 (大日本製薬) を 2000 倍希釈した溶液中で室温にて 1 時間振盪した。洗浄液中で室温にて 5 分間の振盪を 2 回繰り返し、20mmol/L Tris, 500mmol/L NaCl, pH7.5 中で室温にて 5 分間振盪した。ニトロセルロース膜を Immun-blot assay kit (Bio-Rad 社) の試薬である Developer と室温にて 5 分間振盪し、発色反応を行い、蒸留水で洗浄し、反応を停止させた。

図 4 に示すようにモルモット IgG 画分試料では分子量約 160kDa 付近にモルモット IgG に関する強い発色が認められた (レーン 4 ; モルモット IgG 画分)。一方、モルモット IgE 画分試料では分子量約 160kDa 付近には発色が認められなかった (レーン 5 ; モルモット IgE 画分)。これらのことより、本発明のモルモット IgE 画分が実質的にモルモット IgG を含有しないことが示された。

実施例 2 ; 抗モルモット IgE 抗体の製造

実施例 1 で得られた画分とアジュバント (Titer Max : シグマ社製) を等量混合後、超音波処理により乳化させ、実施例 1 で得られた画分 25 μ g/エマルジョン 0.5mL/マウスとなるよう調製した。この免疫抗原をマウス (BALB/c、4 週齢) に 2 週間間隔で 3 回皮内及び皮下に投与した。3 回目の免疫から 1 週間後に、マウスより脾臓細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞と PEG 法にて細胞融合した。融合後、ハイブリドーマを 96 ウェルプレートに分注し、37°C の炭酸ガス

培養器(5% CO₂, 37°C) 中で 1-2 週間培養し、HAT 培地による選択を行った。

モルモット I g E 画分を固相化したマイクロプレートを用いて、融合細胞の上清を ELISA 法により検出し、抗体の有無を確認した。陽性となったウエルに対しては、限界希釈法によるクローニングを 2 回繰り返し、モルモット I g E に

5 対する反応性を有するクローンを選出した。得られたクローンの產生するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を BALB / c マウスの腹腔内で増殖させた後、その腹水中からプロテイン G セファロースゲルを用いて精製した。

実施例 3 ; サンドイッチ ELISA 試薬の製造

サンドイッチ ELISA 法によるモルモット I g E の測定用試薬を以下のように製造した。

(1) 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識マウス抗モルモット I g E モノクローナル抗体の調製

西洋ワサビペルオキシダーゼ 4mg を蒸留水 1mL に溶解し、その 600 μL に 0.1mol/L 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 120 μL を加えて、室温で 20 分間反応させた。この溶液を 1mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.4) に対して一夜透析し、過ヨウ素酸酸化ペルオキシダーゼ溶液を得た。過ヨウ素酸酸化ペルオキシダーゼ溶液 300 μL に、0.2mol/L 炭酸緩衝液を 15 μL 加えて、実施例 2 において製造したマウス抗モルモット I g E モノクローナル抗体 (2mg/mL) を混合し、常温、遮光下で 2 時間インキュベーションした。その後、4mg/mL 水素化ホウ素ナトリウムを 25 μL 加え、4°C で 2 時間放置した。50mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) に一晩透析した。

(2) マウス抗モルモット I g E 抗体の担体へのコーティング

実施例 2 において得られたマウス抗モルモット I g E 抗体を抗体液用緩衝液 (5mmol/L リン酸塩、0.9% NaCl pH7.0) に 10 μg/mL となるように溶解した。

25 これをマイクロタイタープレート (マイクロモジュールプレート、Maxsorp-F8、Nunc 社) に 200 μL ずつ分注し、4°C で 3 晩放置した。

(3) マイクロタイタープレートのブロッキング

各ウェルを 300 μ L のプレート洗浄液 (40mmol/L リン酸塩、0.9%NaCl、0.1%防腐剤 [プロクリン 150 ; ローム・アンド・ハース社] 0.1%ウシ血清アルブミン pH7.0) で 3 回洗浄後、保存用緩衝液 (0.1%プロクリン 150、1%プロックエース [登録商標] 粉末 ; 大日本製薬) 300 μ L を加え室温で 2 時間放置し、
5 その後保存用緩衝液を除去した。

(4) 標準物質の調製

前記と同様にして非還元性条件にて、モルモット I g E 画分の SDS-PAGE を行い、ゲルをクマシーブリリアントブルー染色した。染色したゲルをデシントメーター (島津二波長フライングスポットスキャニングデンシトメータ CS-9300PC) で計測した。約 200 kDa のモルモット I g E 主バンドの染色強度の割合を求めた結果、79% であった。本画分を BCA protein assay kit (Pierce 社) で蛋白定量し、その蛋白濃度に 0.79 を乗じた値を本画分中のモルモット I g E 濃度とした。本画分をウシ胎児血清で希釈し、0, 25, 50, 100, 200, 400, 800ng/mL の標準溶液を調製した。

15 実施例 4 ; 実施例 3 で製造した試薬によるモルモット I g E の測定

(1) 標準曲線の作成

マイクロタイタープレートの各ウェルに反応用緩衝液 (20mmol/L 2-モルホリノエタンスルホン酸-NaOH, 0.9%NaCl, 0.1% BSA, 0.2%プロクリン 150) を 100 μ L 分注した。ここに、標準物質 (0, 50, 100, 200, 400, 800ng/mL) を
20 同様に各ウェルに 25 μ L 加え、室温で 1 時間放置した。また、各ウェルを洗浄液 300 μ L で 3 回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識マウス抗モルモット I g E モノクローナル抗体を希釈液で希釈し、100 μ L ずつ加え、室温で 1 時間放置した。次に、各ウェルを洗浄液 300 μ L で 3 回洗浄後、TMB 溶液を 100 μ L ずつ加え、室温遮光下で 30 分間反応させた。その後、3.2mol/L 硫酸を 100 μ L
25 ずつ加え反応を停止させた。各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて主波長 450nm、副波長 630nm で測定した。図 5 に標準モルモット I g E (800ng/ml) の希釈系列試料の測定結果を示した。この図は良好な標準曲線が得

られたことを示している。

(2) 試薬の基礎性能試験

(ア) 希釀試験

上記(1)の方法に従ってモルモット血清検体の希釀試験を行った。血清は
5 I g E 量の不明な血清 3 検体を検体希釀液でそれぞれ希釀系列を調製し、同時に測定した標準モルモット I g E から得られた標準曲線に基づいて、検体の I g E 濃度を算出した。図 6 の結果に示すとおり、ほぼ原点を通る良好な希釀直線性が得られた。

(イ) 添加回収試験

10 上記(1)の方法に従ってモルモット I g E の添加回収試験を行った。血清検体 3 検体に標準モルモット I g E を添加し、測定値から添加した I g E 量の回収率を求めた。下記表 1 に示すとおり、添加回収率は 98.9% から 109.7% と良好な結果が得られた。

15 [表 1]

検体	添加濃度 (ng/mL)	測定濃度 (ng/mL)	理論濃度 (ng/mL)	回収量 (ng/mL)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
A	0	74.7	74.7	—	—	—
	178.7	249.0	253.4	174.3	97.5	98.9
	342.5	417.9	417.2	343.2	100.2	
B	0	82.6	82.6	—	—	—
	178.7	278.8	261.3	196.2	109.8	109.7
	342.5	458.1	425.1	375.5	109.6	
C	0	66.1	66.1	—	—	—
	178.7	233.2	244.8	167.1	93.5	99.1
	342.5	424.4	408.6	358.3	104.6	

(ウ) 同時再現性試験

上記(1)の方法に従って、同一のモルモット血清サンプルを 8 回測定して、
20 同時再現性試験を実施した。その間の変動係数 C V % は 1.8 % 以下という良好な成績であった。

(エ) 交差反応性試験

上記（1）の方法に従って、精製モルモット Ig G 及び精製モルモット Ig M (Cortex 社) を試料として測定した結果、下記表 2 に示すように、Ig G 及び Ig M とはほとんど交差しなかった（交差反応率は、0.0001%未満）。よって、本測定系はモルモット Ig G 及びモルモット Ig M には交差反応しない測定系であり、モルモット Ig E に特異的な測定系であることが示された。

[表 2]

モルモット イムノグロブリン	試料濃度 (μ g/mL)	測定値 (ng/mL)	交差反応率 (%)
IgE	0.8	800	100
IgG	1429	1.2	0.00008
IgM	900	0.3	0.00003

これらの基礎性能試験の結果は、本発明の免疫測定試薬は非常に高い精度でモルモット Ig E を測定することができる事を示すものである。

また、本発明の免疫測定用試薬は、わずか 25 μ L のモルモット血清中に存在する 6.2 ng/mL、さらには 3.1 ng/mL のモルモット Ig E が検出可能であり、非常に感度が高いものであった。本発明の免疫測定用試薬では、測定可能なモルモット Ig E の濃度範囲を適宜設定することができるが、例えば血液試料の場合、約 3 ~ 約 800 ng/mL の範囲が好適である。なお、本発明の免疫測定用試薬で正常モルモットの血液中 Ig E 濃度を測定したところ、31.9 ~ 97.6 ng/mL であった。

実施例 5 ; OVA を認識するモルモット Ig E の測定

(1) OVA を認識するモルモット Ig E 標準物質の調製

実施例 3 で調製したモルモット Ig E 標準物質を OVA 固相化カラムに展開して、OVA を認識するモルモット Ig E だけを吸着させた。カラムを通過したモルモット Ig E を実施例 4 に記載の方法で定量し、カラムに展開したモルモット Ig E 量から差し引くことによりカラムに吸着した OVA を認識するモ

ルモット I g E の濃度を求めた。

以下、詳細に説明する。

(a) OVA 固相化カラムの調製

NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (アマシャムバイオサイエンス社製)

5 を 5mL カラムにとり、イソプロパノールを除去した。氷冷した 30mL の 1 mmol/L HCl で洗浄後、最終濃度が 10mg/mL OVA となるようにカップリング緩衝液 (0.5 mol/L NaCl, 0.2 mol/L 炭酸ナトリウム [sodium carbohydrate], pH8.3) で希釈した溶液を 5mL 加え、室温で 30 分間静置した。30mL のカップリング緩衝液、30mL の洗浄緩衝液 (0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム [sodium acetate], pH 4.0)、30mL のブロッキング緩衝液 (0.15 mol/L Tris-HCl, pH 8.8) で洗浄し、室温で 1 時間静置した。30mL の洗浄緩衝液、30mL のブロッキング緩衝液、30mL の洗浄緩衝液で洗浄した。OVA を固相化した NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow ゲルを展開緩衝液 (20mmol/L リン酸ナトリウム [sodium phosphate], pH 7.0) で懸濁し、ゲル容量が 1mL となるように別のカラムに詰
10 15 めた。

(b) OVA 固相化カラムクロマトグラフィーによる OVA を認識するモルモット I g E 濃度の測定

前項で調製した OVA 固相化 Sepharose 4 Fast Flow カラム (ゲル容量: 1mL) を前項と同様の展開緩衝液 10mL で平衡化した。760 ng/mL のモルモット I g E 濃度を実施例 4 に記載の方法で定量した。定量した結果を下記表 3 に示した。カラムを通過した分画中のモルモット I g E の積算量は 19.2ng であった。カラムに展開したモルモット I g E 量 (76 ng) からカラムを通過したモルモット I g E 量 (19.2ng) を差し引くことにより、カラムに吸着した OVA を認識するモルモット I g E 量 (56.8ng) を求めた。これより、上記 OVA 固相化カラムクロマトグラフィーに用いたモルモット I g E 標準物質試料 (760ng/mL) 中には

568ng/mL のOVAを認識するモルモットIgEが含有されていることが示された。

[表3]

fraction No.	IgE測定値 (ng/mL)	分画(1ml)あたりの IgE量(ng)
1	8.1	8.1
2	9.3	9.3
3	1.4	1.4
4	0.4	0.4
5	0	0
6	0	0
7	0	0
合計		19.2

5

(2) 西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識OVAの調製

(a) OVAのSATA修飾

27mg のOVA (シグマ社製) を1mL の0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) で溶解した。最終濃度が24 mmol/L SATA (N-Succinimidyl S-acetylthioacetate,

10 ピアス社製)となるようにN,N'-dimethylformamideで希釈した溶液を調製し、上記OVA溶液に0.1mL 添加し、30°Cで30分間インキュベートした後、0.1mL の0.1 mol/L EDTA溶液 (pH7.0)、0.1mL の1 mol/L Tris-HCl (pH7.0)、0.15 mL の1 mol/L ヒドロキシルアミン (hydroxylamine) (pH7.0)を添加し、30°Cで15分間インキュベートした。Hi-Trap G-25 (5mL) カラムに展開し (展開緩衝液
15 : 0.1mol/L リン酸ナトリウム pH6.0, 5mmol/L EDTA、流速 : 0.5mL/min、分画容量 : 0.5mL) で精製後、最終濃度が4mg/mLとなるようにOVA-SATA修飾溶液を調製した。

(b) HRP-Sulfo-HMCSの調製

16mg のHRP (東洋紡社製、TYPE I-C) を2.0mL の0.1mol/L リン酸緩衝液

(pH7.0)で溶解した。4mgのSulfo-HMCS (N-(8-Maleimidocapryloxy)sulfosuccinimide, sodium salt 同仁化学研究所社製)を0.275mLの0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)で溶解した。上記HRP溶液全量に、0.2mLのSulfo-HMCS溶液を加え、30°Cで60分間インキュベートした。Hi-Trap G-25 (5mL)カラムに展開し (5 展開緩衝液: 0.1mol/L リン酸ナトリウム pH6.0, 5mmol/L EDTA、流速: 0.5mL /min、分画容量: 0.5mL) で精製後、最終HRP濃度が7.2mg/mLとなるようにHRP-Sulfo-HMCS溶液を調製した。

(c) OVAのHRP標識

OVA-SATA修飾溶液と等量のHRP-Sulfo-HMCS溶液を混合し、4°Cで20時間インキュベートした。10mmol/Lシステアミン塩酸塩(Cysteamine Hydrochloride)を1mLあたり20μL添加した。Sephacryl S-200 XK-26/70カラム(展開緩衝液: 0.1mol/L リン酸ナトリウム pH6.5、流速: 0.8mL/min、分画容量: 2.0mL)に展開し、ゲルろ過分画した。各分画のHRP活性及び、力価測定より回収画分を決定した。

15 (3) 標準曲線の作成

プラスチック製マイクロプレートの各ウェルに150μLの反応用緩衝液(20mmol/L 2-モルホリノエタンスルホン酸-NaOH, 0.9%NaCl, 0.1% BSA, 0.2%プロクリン150)を分注し、さらに前項(1)において調製した標準物質の希釈系列(0, 35.5, 71.0, 141.9, 283.9, 568 ng/mL)を同様に各ウェルに15μL加え、攪拌後室温で10分間放置した。プラスチック製マイクロプレートの各ウェルより110μLずつ試料を取り出し、実施例3において調製したマウス抗モルモットIgE抗体をコーティングしたマイクロタイタープレートの各ウェルに分注し、攪拌後、室温で1時間放置した。各ウェルを洗浄液300μLで3回洗浄後、上記調製の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識OVAを100μLずつ加え、室温で30分間放置した。次に、各ウェルを洗浄液300μLで3回洗浄後、TMB溶液を100μLずつ加え、室温遮光下で30分間反応させた。その後、3.2mol/L硫酸を100μLずつ加え反応を停止させた。各ウェルの吸光度をマイクロプレート

トリーダーを用いて主波長 450nm、副波長 630nm で測定した。図 7 に前項（1）において調製した I g E 標準物質 (568 ng/ml) の希釈系列試料の測定結果を示した。この図は良好な標準曲線が得られたことを示している。

（4）試薬の基礎性能試験

5 (ア) 希釈試験

前項（3）の方法に従ってモルモット血清検体の希釈試験を行った。血清は OVA を認識する I g E 量の不明な血清 3 検体を検体希釈液でそれぞれ希釈系列を調製し、前項（3）と同様にして得られた標準曲線に基づいて、検体中の、OVA を認識する I g E 濃度を算出した。図 8 の結果に示すとおり、ほぼ原点 10 を通る良好な希釈直線性が得られた。

（イ）添加回収試験

前項（3）に記載の方法に従って OVA を認識するモルモット I g E の添加回収試験を行った。血清検体 5 検体に前項（1）と同様にして調製された標準モルモット I g E を添加し、測定値から添加した I g E 量の回収率を求めた。

15 下記表 4 に示すとおり、添加回収率は 97.7% から 103.7% と良好な結果が得られた。

[表 4]

検体	添加濃度 (ng/mL)	測定濃度 (ng/mL)	理論濃度 (ng/mL)	回収量 (ng/mL)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
A	0	86.7	86.7	—	—	—
	183.1	278.6	269.8	191.9	104.8	—
	384.3	458.6	471.0	371.9	96.8	100.8
B	0	164.6	164.6	—	—	—
	183.1	364.6	347.7	200.0	109.2	—
	384.3	541.9	548.9	377.3	98.2	103.7
C	0	201.4	201.4	—	—	—
	183.1	390.9	384.5	189.5	103.5	—
	384.3	575.0	585.7	373.6	97.2	100.4
D	0	456.4	456.4	—	—	—
	183.1	642.9	639.5	186.5	101.9	—
	384.3	815.9	840.7	359.5	93.5	97.7
E	0	0.6	0.6	—	—	—
	183.1	192.9	183.7	192.3	105.0	—
	384.3	380.8	384.9	380.2	98.9	102.0

(ウ) 同時再現性試験

前項(3)の方法に従って、同一のモルモット血清サンプルを8回測定して、
5 同時再現性試験を実施した。その間の変動係数C V %は5%以下という良好な成績であった。

(エ) 特異性試験

O V Aを感作したモルモット(H a r t l e y系)及び無感作のモルモット(同系)より採取した血清検体を試料として、実施例4及び本実施例において10 使用した測定試薬によってI g E量を測定し、得られた値を比較した。感作は20mgのO V A(シグマ社製)を0.8mLの生理食塩水に溶解し、モルモットの腹腔内と背側皮下に0.4mLずつ注入することにより行い、感作から6週間後にモルモットから血液を採取した。

下記表5の測定結果に示すように、無感作モルモット血液中においては、実15 施例4に記載の試薬によって測定した場合にはI g Eが検出され、本実施例に記載の試薬によって測定した場合I g Eは検出されなかった。これに対し、O V A感作モルモットにおいては、両試薬で測定した場合ともにI g Eが検出され、その濃度は実施例4に記載の試薬で測定した場合の方が高かった。この結

果は、実施例4に記載の試薬はOVAを認識するIgE及びそれ以外のIgEを測定しており、本実施例に記載の試薬はOVAを認識するIgEを特異的に測定していることを意味している。

[表5]

モルモット 個体番号	感作の 有無	実施例5に記載の測定方法 (ng/mL)	実施例4に記載の測定方法 (ng/mL)
1	無	0	19.7
2	無	0	26.1
3	無	0	10.9
4	無	0	174.0
5	無	0	46.8
6	有	174.0	438.7
7	有	132.2	579.6
8	有	209.1	666.5
9	有	79.4	428.9
10	有	189.1	1177.8

5

(オ) PCA反応との相関性試験

血液中に存在するOVAを認識するIgEの指標であるモルモットのPCA反応と、本実施例の測定系との相関性を次のようにして検討した。18匹のHartley系モルモットを対象とし、その中の1匹にはOVA感作を行わず

10 に血液を採取し、常法に従い血清を得た。残りの17匹には、腹腔内と背側皮下に25mg/mLのOVA生理食塩水溶液を注入して感作した。感作後、6週間に至るまで、感作したモルモットを経時的に屠殺して血液を採取し、常法に従い血清を得た。このようにして得られた血清中のIgE量を本実施例に記載の方法により測定した。

15 PCA反応は次のようにして実施した。採取したモルモット血清を生理食塩水にて10倍、20倍、40倍及び80倍に希釈し、希釈系列を調製した。Hartley系モルモットをエーテル麻酔し、背皮毛を刈り、皮膚に調製した希釈系列試料を0.1mLずつ皮内注射した。7日間モルモットを飼育後、前

肢より1mg/mL OVA及び1%エバンスブルーの生理食塩水液を1mL注

20 入し、30分間放置した。モルモットを屠殺後、背皮を剥いで、青い斑点が認

められる最高希釀倍率をPCA反応値とした。図9に示すように、本実施例の測定系とPCA反応との間には、回帰式 $y = 2.2x + 4.8$ 、相関係数 $r = 0.967$ という非常に良好な相関関係が認められた。このような試験結果は、本実施例のモルモットIgEの免疫測定試薬は、OVAを認識するIgEを特異的に測定できることを示すものである

産業上の利用可能性

本発明は、高度に精製されたモルモットIgE画分、特異性に優れた抗モルモットIgE抗体、及び該抗体を含むモルモットIgEを正確かつ簡便に測定可能な試薬を提供する。このような本発明により、アレルギーなどの動物実験の現場において、例えば、モルモット血液中のIgE濃度を感度良く測定することができる。

以上、本発明の具体的な態様のいくつかを詳細に説明したが、当業者であれば示された特定の態様には、本発明の教示と利点から実質的に逸脱しない範囲で様々な修正と変更をなすことは可能である。従って、そのような修正及び変更も、すべて後記の請求の範囲で請求される本発明の精神と範囲内に含まれるものである。

本出願は、日本で出願された特願2003-434618（出願日：2003年12月26日）及び特願2004-289939（出願日：2004年1月1日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. アレルゲンで感作されたモルモットの血液から分離され、S D S - P A G Eにより免疫グロブリンEの単一の主バンドを得るのに充分な純度をもつ本質的に精製された下記性状を有するモルモット免疫グロブリンEからなる画分；
 - 5 (1) 前記主バンドの分子量は約 2 0 0 k D a である、
 - (2) モルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体を製造するための抗原として使用できる、
 - (3) モルモットにおける受動皮膚アナフィラキシー反応が陽性である、 - (4) 実質的にモルモット免疫グロブリンGを含有しない。
 - 10 2. 請求の範囲 1 に記載の画分において、主バンドの分子量が 1 8 7 ~ 1 9 5 k D a であるモルモット免疫グロブリンEからなる画分。
 - 15 3. モルモット免疫グロブリンEの分子量が質量分析法により測定して約 1 8 6 k D a である請求の範囲 1 又は 2 に記載のモルモット免疫グロブリンEからなる画分。
 4. 前記主バンドが還元性 S D S - P A G E により 2 つに分離され、分離後の各バンドの分子量が約 7 0 k D a 及び約 3 0 k D a である、請求の範囲 1 ~ 3 に記載の画分。
 5. アレルゲンが卵白アルブミンである請求の範囲 1 ~ 4 に記載のモルモット免疫グロブリンEからなる画分。
 - 20 6. 請求の範囲 1 ~ 5 に記載の免疫グロブリンEからなる画分でもってヒト以外の動物を免疫して製造されるモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体。
 7. 抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲 6 に記載のモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体。
 - 25 8. 抗体がモルモット免疫グロブリンG 又は免疫グロブリンMと実質的に交差反応しないものである請求の範囲 6 又は 7 に記載の抗体。
 9. モルモット免疫グロブリンG 及び免疫グロブリンMとの交差反応率が 0 .

0001%未満であるモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体。

10. 請求の範囲6～9に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

5 11. 請求の範囲6～9に記載の抗体及び酵素標識された前記抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

12. 免疫測定用試薬がサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法を実施するための試薬である請求の範囲10又は11に記載のモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

10 13. 固相化された請求の範囲6～9に記載の抗体及び標識物質により標識された卵白アルブミンを含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

14. 固相化された卵白アルブミン及び標識物質により標識された請求の範囲6～9に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

15 15. 標識物質が酵素である請求の範囲13又は14に記載のモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

16. モルモット免疫グロブリンEが卵白アルブミンを認識する免疫グロブリンEである請求の範囲13～15のいずれかに記載の免疫測定用試薬。

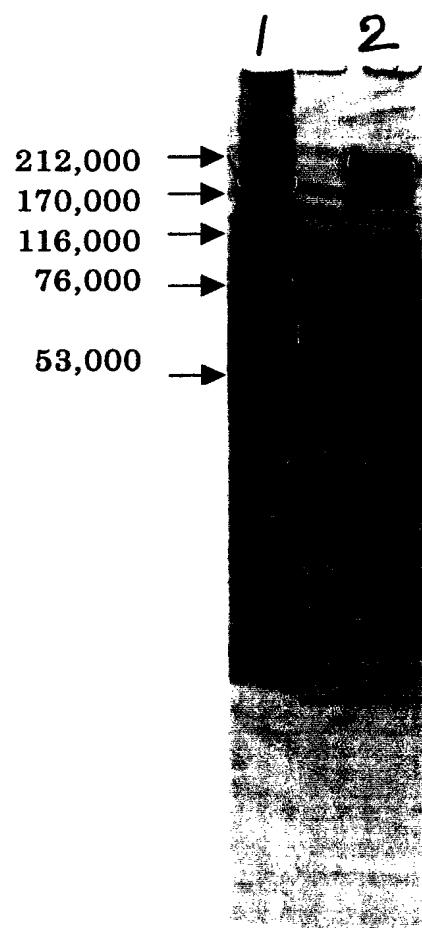
17. 固相化されてなる請求の範囲6～9に記載の抗体。

18. モルモット免疫グロブリンEを製造または精製するための請求の範囲

20 17に記載の抗体。

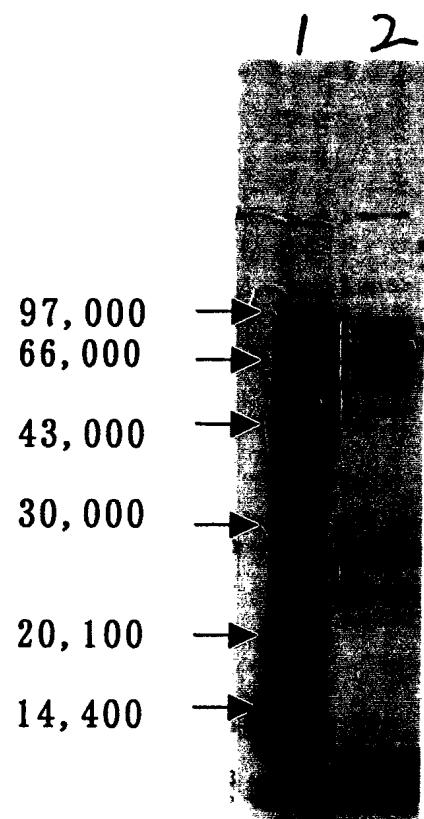
1 / 1 1

図 1



2 / 1 1

図 2



3 / 1 1

図 3



250ng/mL



125ng/mL



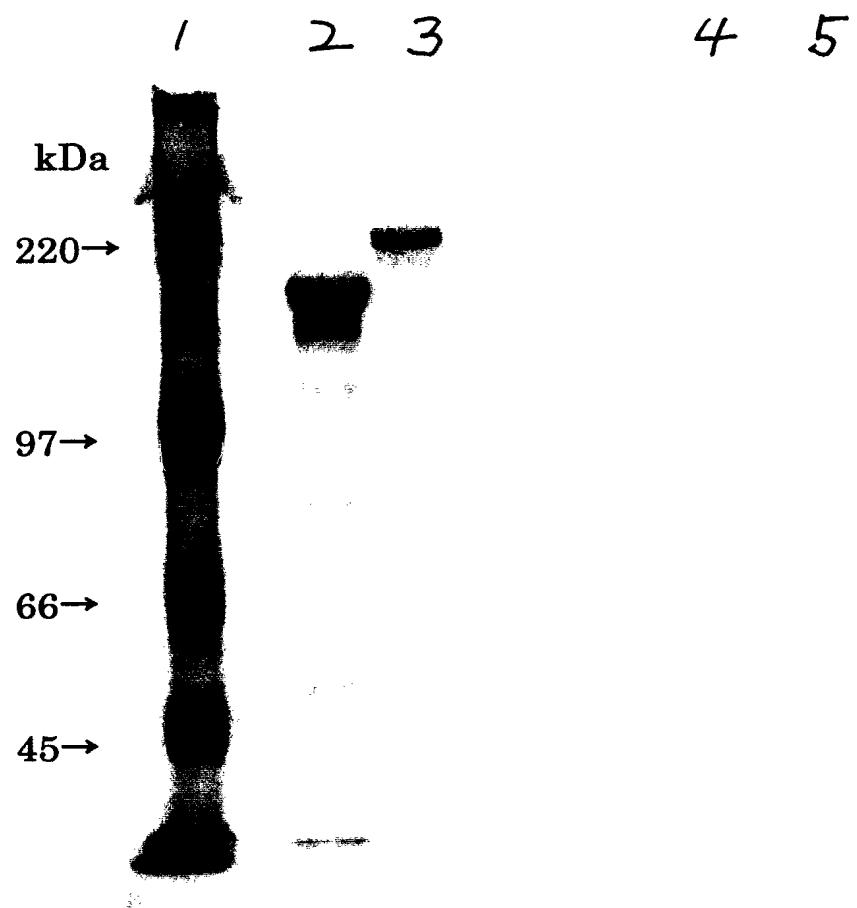
62.5ng/mL



31.3ng/mL

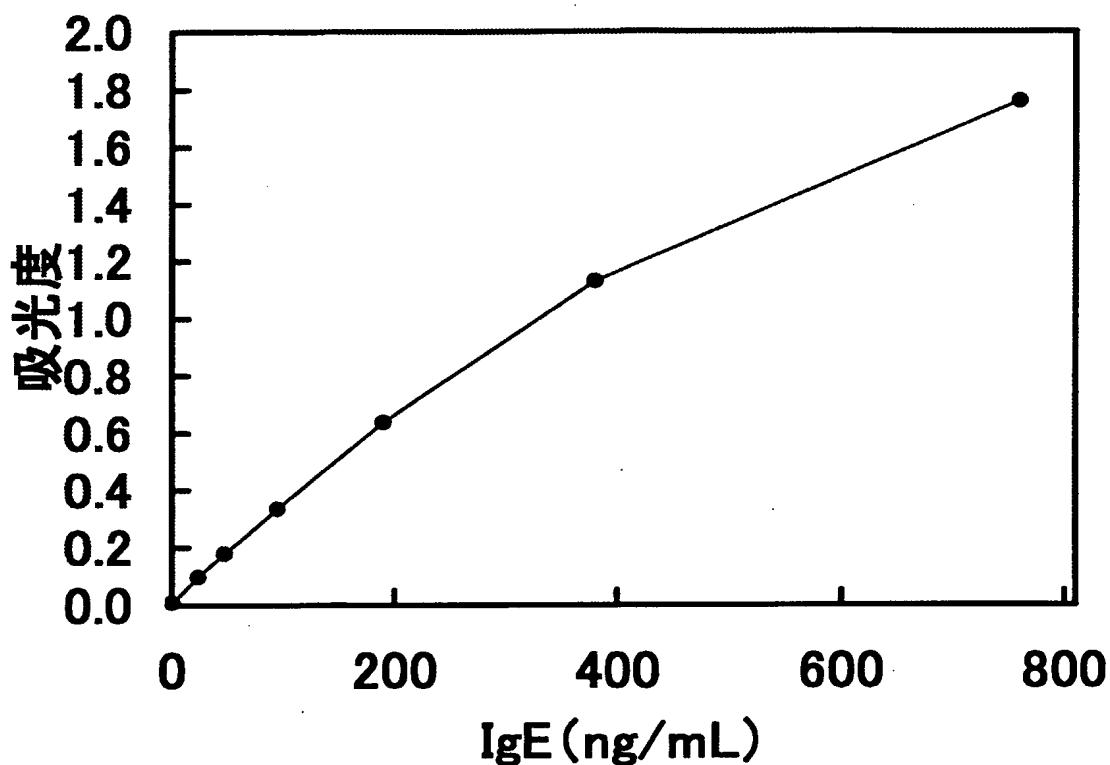
4 / 1 1

図 4



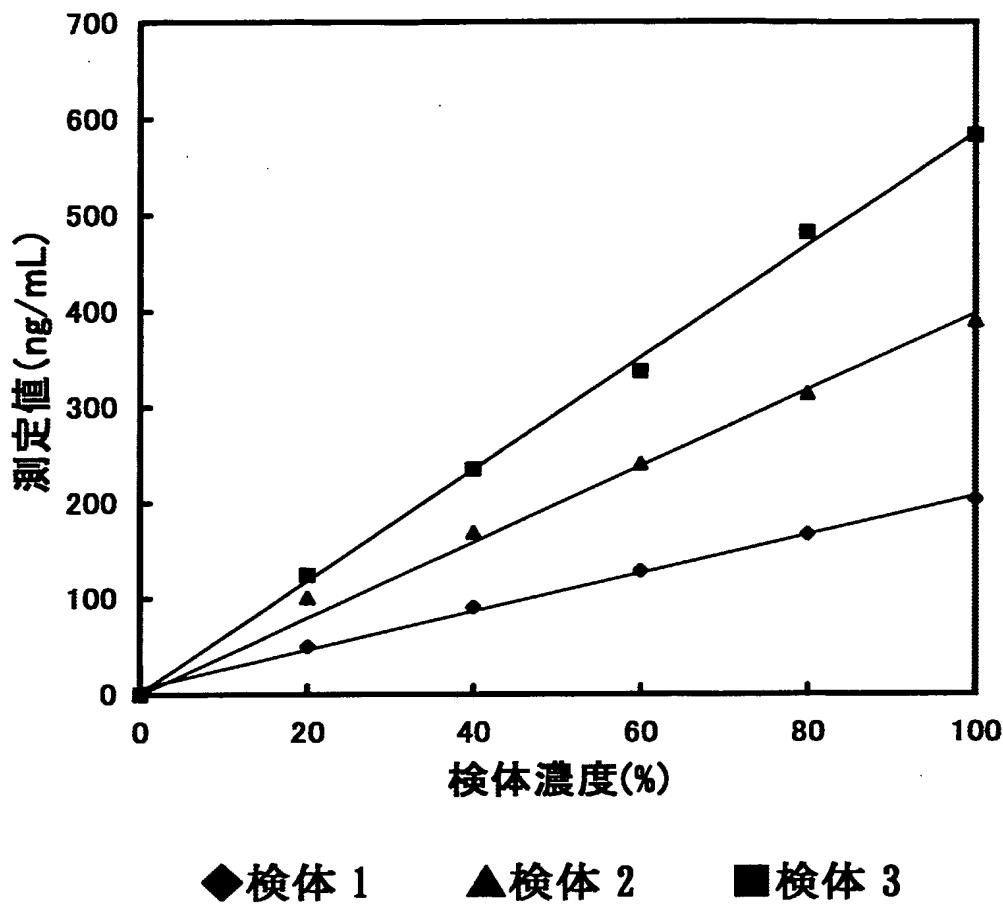
5 / 1 1

図 5



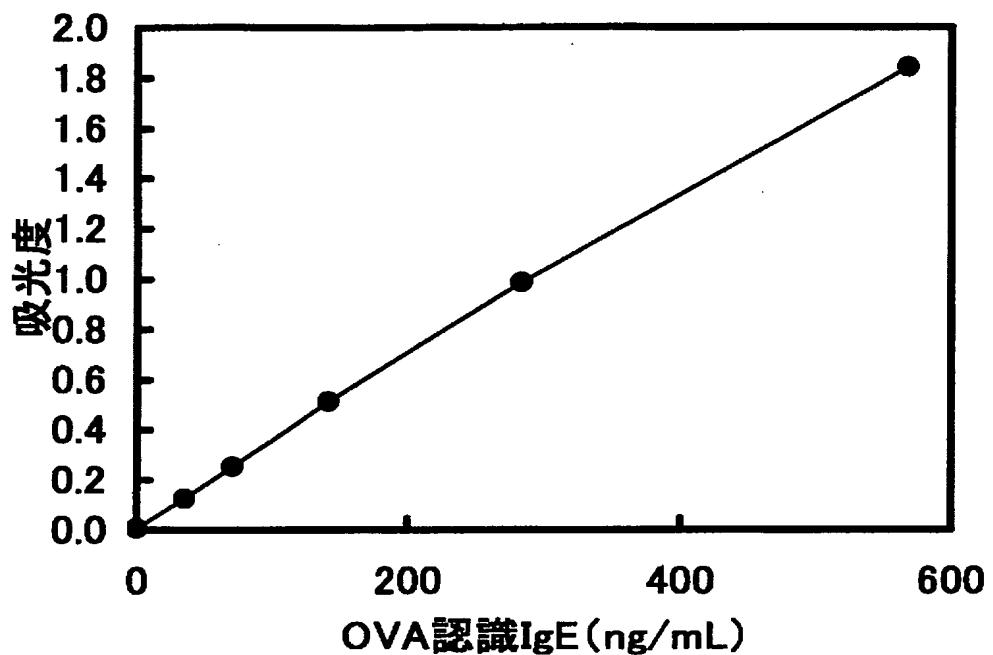
6 / 1 1

図 6



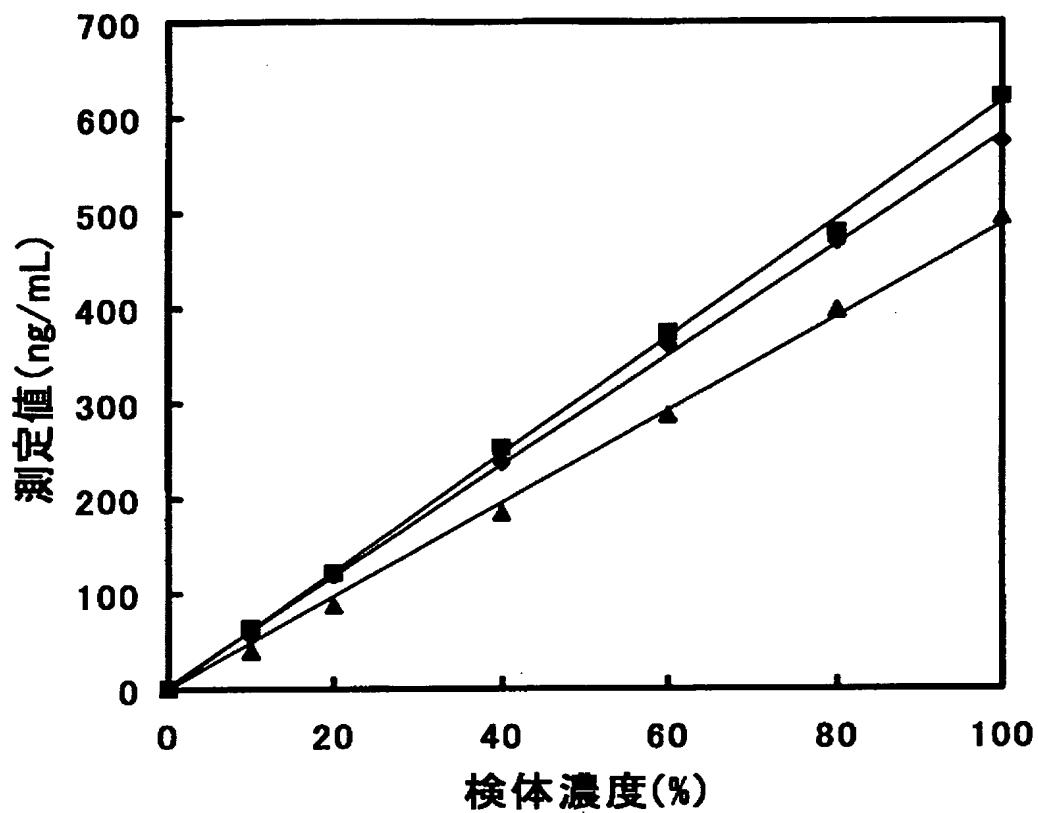
7 / 1 1

図 7



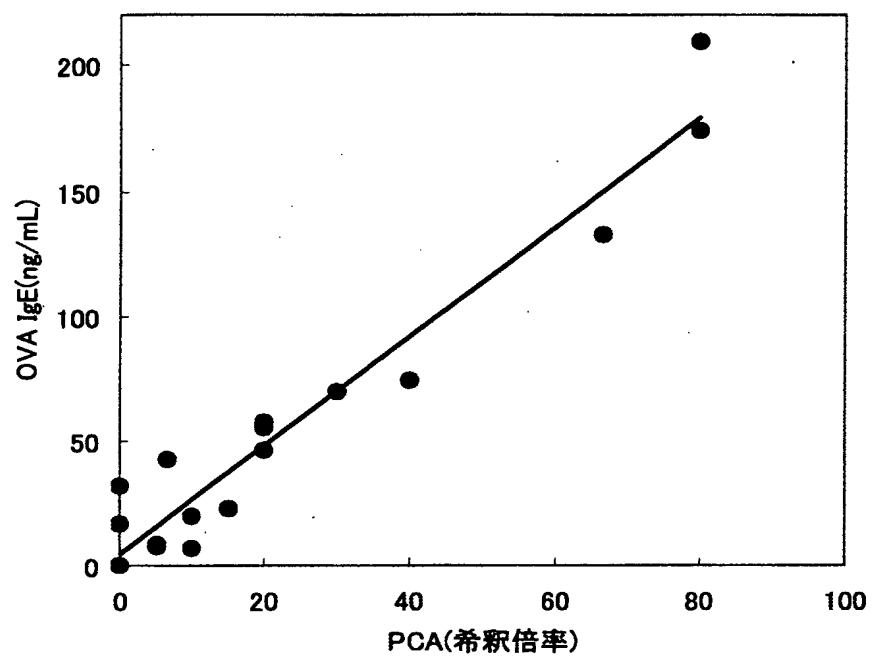
8 / 1 1

図 8



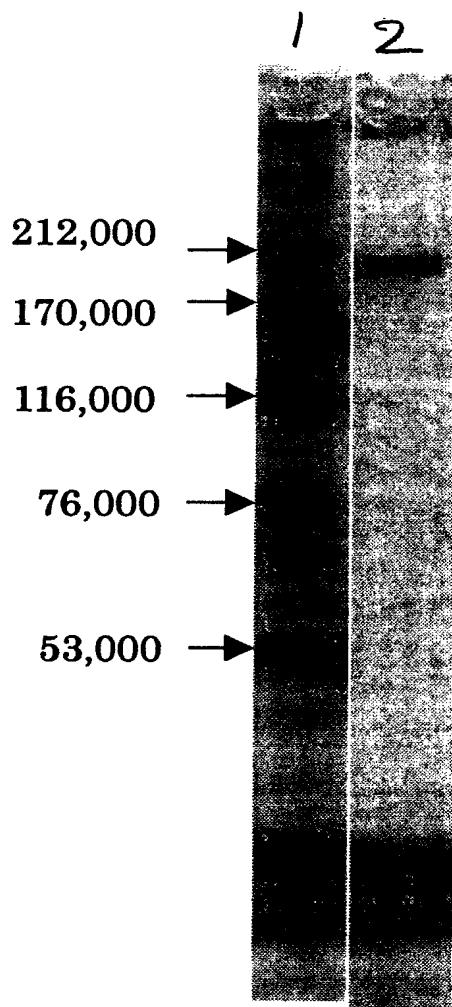
9 / 1 1

図 9



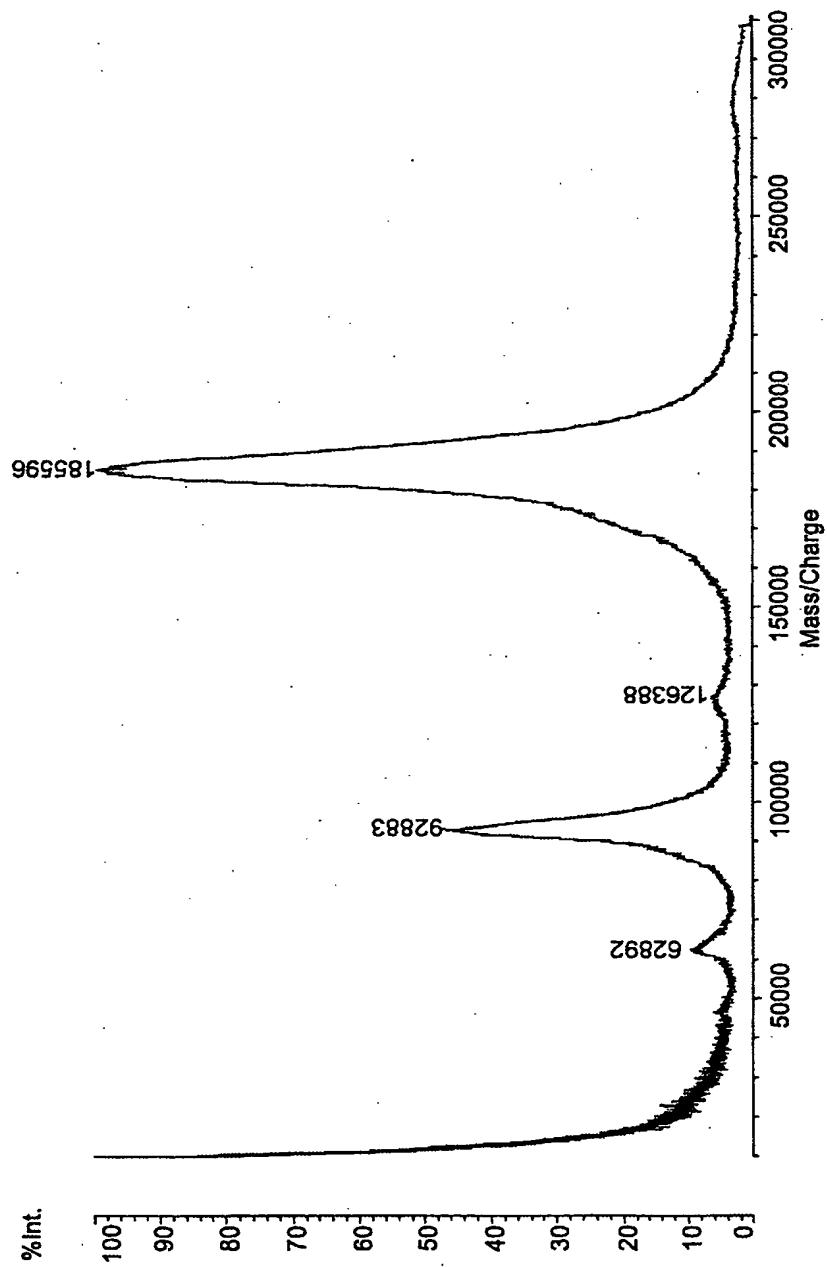
1 0 / 1 1

図 1 0



1 1 / 1 1

図 1 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C07K16/18, C07K16/42, G01N33/53, G01N33/543,
C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, C07K16/18, C07K16/42, G01N33/53, G01N33/543,
C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Karol, M. et al., "Production and isolation of guinea pig IgE antibody", Journal of Immunological Methods, (1991), Vol.139, No.1, pages 123 to 134, a reference cited in the specification of the present application	1-18
Y	ITO, K. et al., "Preparation of antibodies to guinea pig IgE and its use for enzyme-linked immunosorbent assay of IgE antibodies", International Archive of Allergy and Applied Immunology, (1985), Vol.77, No.4, pages 438 to 444, a reference cited in the specification of the present application	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 March, 2005 (25.03.05)

Date of mailing of the international search report
12 April, 2005 (12.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019694

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-266748 A (Morinaga & Co., Ltd.), 29 September, 2000 (29.09.00), Claims; a reference cited in the specification of the present application (Family: none)	1-18
Y	JP 2000-266747 A (Morinaga & Co., Ltd.), 29 September, 2000 (29.09.00), Claims; a reference cited in the specification of the present application (Family: none)	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/00, C07K16/18, C07K16/42, G01N33/53, G01N33/543, C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/00, C07K16/18, C07K16/42, G01N33/53, G01N33/543, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Karol, M. ET AL., "Production and isolation of guinea pig IgE antibody" Journal of Immunological Methods, (1991), Vol. 139, No. 1, pp. 123-134, 本願で引用	1-18
Y	Ito, K. et al., "Preparation of antibodies to guinea pig IgE and its use for enzyme-linked immunosorbent assay of IgE antibodies" International Archives of Allergy and Applied Immunology, (1985), Vol. 77, No. 4, pp. 438-444, 本願で引用	1-18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 25.03.2005	国際調査報告の発送日 12.4.2005	
国際調査機関の名称及び先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新留 豊	4 B 9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JP 2000-266748 A (森永製菓株式会社), 2000.09.29 請求の範囲参照, 本願で引用 (ファミリーなし)	1-18
Y	JP 2000-266747 A (森永製菓株式会社), 2000.09.29 請求の範囲参照, 本願で引用 (ファミリーなし)	1-18